เอกสารอ้างอิง

1 Casida, L. E. (1968). Antibiotic Fermentation . In Industrial Microbiology,pp.221-257.U.S.A.:Wiley, J., and Sons, Inc.

2 Alcamo, I. E. (1983). Chemotherapeutic Agents and Antibiotics. In Fundamentals of Microbiology , pp. 669-702. U.S.A. :Addison-Wesley Publishing Company, Inc.

3 มาลินี ลิ้มโภคา . (2527). กลุ่มยาเพนนิซิลลิน. ใน การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ ยาซัลฟา และสารปฏิชีวนะ) พิมพ์ครั้งที่ 3 หน้า 199-215 กรุงเทพ ฯ : ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

4 Garrod, L. P.,Lambert, H. P.,O'Grady, F.,and Waterworth, P. M. (1981).Penicillins.In Antibiotic and Chemotherapy ,5 th. ed.,pp.3-90 . England : William CLowes Limited .

5 Batchelor, F. R., Doyle, F. P., Nayler, J. H. C.,and Rolinson, G. N.(1959).Synthesis of Penicillin:6- Aminopenicillanic Acid in Penicillin Fermentation. Nature Vol.183:257-258.

6 Crueger, W., and Crueger, A. (1987). Strain Development. In Biotechnology , pp.9-15 . New York : Academic Press.

7 Queener, S., and Swartz, R.(1979). Penicillin:Biosynthetic and Semisynthetic. In Rose, A. H.(ed.),Economic Microbiology Vol.3 , pp.35-74. London : Academic Press .

8 Bryant, M. C. (1972). Antibiotics. In Baker, F. J.,(ed.), Antibiotics and their Laboratory Control , 2 nd.ed., pp. 3-33 . England: Bros (Nor wich) Ltd.

9 Veenstra, A. E., Van Solingen, P., Huininga-Muurling, H., Koekman, B. P., Groenen, M. A. M., Smaal, E. B., Kattevilder, A., Alvarez, E., Barredo, J. L., and

Martin, J. F.(1986).Cloning of Penicillin Biosynthetic Genes. In Hershberger, C.L.,Queener, S. W.,and Hegeman, G. (eds.), Genetic and Molecular Biology of Industrial Microorganisms, pp. 377. Washinton, D.C.: American Society for Microbiology .

10 Baldwin, J. E.,Abraham, E. P.,Adlington, R. M.,Chakravarti, B., Derome, A. E.,Murphy, J. A., and (in part) Field, L. D., Green, N. B., Ting, H. H., and Usher, J. J. (1983). Penicillin Biosynthesis dual Pathways from a Modified Substrate. J.Chem.Soc.Chem.Commun.Vol.1983:1317-1319.

11 Hollander, I. J.,Shen, Y. Q.,Heim, J.,Demain, A. L.,and Wolfe,S. (1984).A Pure Enzyme Catalysing Penicillin Biosynthesis. Science Vol.224:610-612.

12 Pang, C.-P.,Chakravarti, B.,Adlington, R. M.,Ting, H. H.,White, R. L., Jayatilake, G. S., Bladwin, J. E., and Abraham, E.P.(1984). Purification of Isopenicillin N Synthetase. Biochem.J.Vol.222: 789-795.

13 EL-Sayed, Abdel-Halim, M. M. (1991). Production of Penicillins and Cephalosporins by Fungi. In Arora, D. K.,Elander, R. P.,and Mukerji, K.G.(eds.),Handbook of Applied Mycology : Fungal Biotechnology Vol.4,pp. 517-564.U.S.A.:Academic Press.

14 Chiang, E.,Shu-Jen, D.,and Elander, R. P.(1991). The Application of Genetic Engineering to Strain Improvement of β-Lactam Producing Filamentous Fungi. In Arora, D. K.,Elander, R. P.,and Mukerji, K.G.(eds.),Handbook of Applied Mycology : Fungal Biotechnology Vol.4,pp.197-211. U.S.A.:Academic Press.

15 **Martin, J. F., Lopez-Neito, M. J., and Castro, J. M.** (1986). β-Lactum Biosynthesis Controlled by Carbon and Nitrogen Regulation . In Kleinkauf,H.,Dohre, H. V., Dornauer, H., and Nesemann,G.(eds.),Regulation of Secondary Metabolite Formation,pp.41-76.Germany: VCH Verlagsgesellschaft MBH.

16 **Soltero, F. V., and Johnson, M.J.** (1954). Continuous Addition of Glucose for Evalution of Penicillin-Producing Cultures. Appl.Microbiol.Vol.2:41-44.

17 **Sanchez, S., Paniagua, L., Mateos, R. C., Lara, F.,and Mora, F.** (1980). In Vining,L.C., and Singh, K.(eds.), Anvances in Biotechnol.Vol.3 , PP.147. Toronto : Pergamon Press.

18 **Stefaniak, J. J., Gailey, F. B., Javis, F. G .,and Johson, M. J.** (1946). The Effect of Environmental Conditions on Penicillin Fermentations with Penicillium chrysogenum X-1612. J.Bacteriol.Vol.52:119-127.

19 **Calam, C. T.,Driver, N.,and Bower, R. H.**(1959).J.Appl.Chem.Vol.1 :209.

20 **Owen, S. P., and Johnson, M. J.**(1955). The Effect of Temperature Changes on the Production of Penicillin by Penicillium chrysogenum W49-133. Appl.Microbiol.Vol.3:375.-379.

21 **Moyer, A. J., and Coghill, R. D.**(1946). Penicillin:Production of Penicillin in Surface Culture. J.Bacteriol.Vol.51: 57-78.

22 **Davey, V. F.,and Johnson, M. J.**(1953). Penicillin production in Corn Steep Medium with Continuous Carbohydrate Addition .Appl. Microbiol.Vol.1:208-211.

23 **Moyer, A. J.,and Coghill, R. D.**(1946). Penicillin:the Effect of Phenylacetic Acid on Penicillin Production. J.Bacteriol.

Vol.53 :329-341.

24 **Smith, E. L.,and Bide, A. E.**(1948). Biosynthesis of Penicillins. Biochem.J.Vol.42 :17-18.

25 **Singh, K.,and Johnson, M. J.**(1948). Evaluation of Precursors for Penicillin G. J.Bacteriol.Vol.56 : 339-355.

26 **Tabenkin, B.,Lehr, H., Wayman, A. C.,and Goldberg, M. W.** (1952). Evaluation of Esters of Phenylacetic Acid as Precursors of Penicillin G. Arch.Biochem.Biophys.Vol.38 :43-48.

27 **Perlman, D.,and O'Brien, E.**(1954). Derivatives of Phenethanol as Precursors for Biosynthesis of Benzylpenicillin. Arch. Biochem.Biophys.Vol.51:266-270.

28 **Arnstein, H. R. V.,and Grant, P. T.**(1954 a). The Biosynthesis of Penicillin: The Incorporation of some Amino Acids into Penicillin. Biochem.J.Vol.57:353-359.

29 ————.,(1954 b). The Biosynthesis of Penicillin: The Incorporation of Cystine into Penicillin. Biochem.J.Vol.57: 360-368.

30 **Stevens, C. M., Inamine, E.,and De Long, C. W.**(1956). The Rate of Incorporation of L-cystine and D- and L- Valine in Penicillin Biosynthesis. J.Biol.Chem. Vol.219:405-409.

31 **Stevens, C. M.,Vohra, P.,and De Long, C. W.** (1954). Utilization of Valine in the Biosynthesis of Penicillins. J.Biol. Chem. Vol. 211:297-300

32 **Stanbury,P.F.,and Whitaker, A.**(1984).The Isolation, Preservation and Improvement of Industrial Microorganism.In Principles of Fermentation Technology,pp.26-73. Great Britain: BPPC Wheatons Ltd.,Exeter.

33 **Ikyta, B.**(1983). Genetic of Industrial Microoganism. In Moss,

M. O.(ed.), Method in Industrial Microbiology ,pp.214-250. Czechoslovakia:Ellis Horwood Ltd.

34 Dulaney, E. L.,and Dulaney, D. D.(1967). Mutation Population of Streptomyces viridifaciens . Tran. N. Y.Acad.Sci.Vol.29: 782-799.

35 Saunders, V. A.,and Saunders, J. R.(1987). Microbial Strain Improvement and Novel Products. In Microbial Genetics Applied to Biotechnology,pp.265-305. England:Croom Helm.

36 Riviere, J.(1977). Antibiotic. In Moss, M. O., and Smith, J. E.,(eds.),Industrial Application of Microbiology, pp.197 -218. Great Britain : Thomson Litho Ltd., East Kilbrid.

37 Tien, W. (1981). Isolation of P. chrysogenum Mutant by Mutation and Selection Technique.Proc.Natl.Sci.Counc.ROC(A).Vol.4 :256-261.

38 Arnstein, H. R. V., and Grant, P. T.(1956).The Metabolism of the Penicillin in Relation to Penicillin Biosynthesis. Bacteriol.Reviews Vol.20:133-147.

39 Crueger, W.,and Crueger, A.(1987). Antibiotic.In Biotechnology, 197-206.New York: Academic Press.

40 Demain, A. L.(1973). Mutation and the Production of Secondary Metabolites.Advan.Appl.Microbiol.Vol.16:177-202.

41 Bradley, S. G.(1966).Genetic in Applied Microbiology. Advan. Appl.Microbiol.Vol.8:29-59.

42 Pontecorvo, G.,and Sermonti, G.(1954).Parasexsual Recombination in P. chrysogenum . J.Gen. Microbiol.Vol.11 : 94-104.

43 Pontecorvo, G.,Roper, J. A., and Forbes, E. (1953).Genetic Recombination without Sexual Reproduction in Aspergillus niger. J.Gen.Microbiol.Vol.8:198-210.

44 Macdonald, K. D.,Hutchinson, J. M.,and Gillett, W. A. (1963). Formation and Segregation of Heterozygous Diploid between a Wild-Type Strain and Derivatives of High Penicillin Yield in Penicillium chrysogenum. J.Gen. Microbiol.Vol. 33:385-394.

45 Buxton, E. W.(1956). Heterokaryosis and Parasexual Recombination in Pathogenic Strain of Fusarium oxysporum. J.Gen. Microbiol.Vol.15:133-137.

46 Anne, J., and Peberdy, J. R. (1967). Induced Fusion of Fungal Protoplasts Following Treatment with Polyethylene-glycol . J.Gen.Microbiol.Vol.92:413-417.

47 Reymond, P.,and Fevre, M. (1985). Recombination Following Protoplast Fusion of Penicillium Strains Used in the Dairy Industry. Enzyme Microbiol. Technol.Vol 8:41-44.

48 Reymond, P., Veau, P.,and Fevre, M. (1986). Production by Protoplast Fusion of New Strain of P. caseicolum for Use in Dairy Industry. Enzyme Microbiol. Technol.Vol.8:45-47.

49 Anne, J.,Eyssen, H.,and De Somer,P.(1976). Somatic Hybridization of P. roquefortii with P. chrysogenum after Protoplast Fusion. Nature (London).Vol.262:719.

50 Alikhanian, S. I.(1962). Induced Mutagenesis in the Selection of Microorganism. Advan.Appl.Microbiol.Vol.4:1-50.

51 Calam, C. T., Daglish, L. B., and McCann, E. P. (1976). Penicillin Tactics in Strain Improvement. In Macdonal, K. D. (ed.), Secondary International Symposium on the Genetic of Industrial Microorganism, pp.273-287. London: Academic Press.

52 Martin, J. F.,and Liras, P. (1985). Biosynthetic of β-Lactum

Antibiotics : Design and Construction of Overproducing Strains. Trends Biotechnol Vol 3 :39-44.

53 Martin, J. F., (1987). Cloning of Genes Involved in Penicillin and Cephalosporin Biosynthesis. Trends Biotechnology Vol. 5:306-308.

54 Samson, S. M., Beragaje, R.,Blankenship, D, T., Chapman, J. L., Perry, D.,Skatrud, P. L.,VanFrank, R. M.,Abraham, E.P., Baldwin, J.E.,Queener, S. W., and Ingolia, T. D.(1985). Isolation , Sequence Determination and Expression in Escherichia coli of the Isopenicillin N Synthetase Gene from Cephalosporium acremonium. Nature(London) Vol.318: 191-194.

55 Leskiw, B. K.,Aharonowitz, K.Y.,Mevarech, M.,Wolfe, S., Vinning, L. C.,Westlake, D. W. S., and Jensen, S. E.(1988). Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Isopenicillin N Synthetase Gene from Streptomyces clavuligerus . Gene Vol.62:187-196.

56 Ramon, D.,Carramolino,L.,Patino, C.,Sanchez, F.,and Penalva, M.A. (1987).Cloning and Characterization of the Isopenicillin N Synthetase Gene Mediating the Formation of the β-Lactum Ring in Aspergillus nidulans. Gene Vol.57:171-181.

57 Carr, L. G., Skatrud, P. L., Scheetz , M. E., Queener, S. W., and Ingolia, T. D. (1986). Cloning and Expression of the Isopenillin N Synthetase Gene from Penicillium chrysogenum. Gene Vol.48:257-266.

58 Dulany,E. L.(1954).Induced Mutation and Strain Selection in some Industrially Important Microorganism. Ann.N.Y.Acad.Sci. Vol.60:155-163.

59 สิรินุช ลามศรีจันทร์. (2527). การกลายพันธุ์ ขบวนการก่อการกลายพันธุ์โดยรังสี ขบวนการก่อการกลายพันธุ์โดยสารเคมี. พันธุศาสตร์รังสี หน้า 102-181. กรุงเทพ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

60 Glass, R. E.(1983). Mutation. Gene function ,pp.1-50. Berkery: University of California .

61 Orgel, L. E.(1965).The Chemical Basic of Mutation.Advan.Enzymol. Vol.27:289-346.

62 Singer, B.(1981). Mutagenic Effects of Nucleic Acid Modification and Repair Assessed by in Vitro Transcription. In Lawrence, C. W.(ed.) , Induced Mutagenesis,pp.1-34. New York : Plenum Press.

63 Brady, S. G.(1960).Genetic in Applied Microbiology. Advan. Appl.Microbiol.Vol.8:29-59.

64 Ohman, D. E. (1988). Experiment 1, Isolation of Arg⁻ Auxotropic Mutants by Chemical Mutagenesis and Enrichment. In Experiments in Gene Manipulation , pp. 15 - 29. U.S.A.: Prentice Hall,Inc., Englewood Cliffs.

65 Setlow, R. B., and Setlow, J. K. (1962). Evidence that Ultraviolet - Induced Thymine Dimers in DNA Cause Biological Damage. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.Vol.48: 1250-1257.

66 Fantini, A. A. (1959). Strain Development. Appl. Microbiol.Vol.7 :24-41.

67 Bridges, B. A. (1976). Mutation Induction. In Macdonal, K. D. (ed.) , Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism.,pp.7-14.London : Academic Press.

68 Druke,J. W., and Abraham Son, S. (1977).Comparative Mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and JCR

-170. In De Serres, F.J., and Shelby, M. D. (eds.), Comparative Chemical Mutagenesis , pp.883-889. New York U.S.A.: 1981 Plenum Press.

69 Joseph, D. M., and Joseph, G.(1960).A New Chemical Mutagen for Bacteria ,1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys.Res.Commun.Vol.6:575-577.

70 Guerola, N., Ingraham, J. L., and Cerda - Olmedo, E. (1971). Introduction of Closely Linked Multiple Mutation by Nitrosoguanidine. Nature New Biology, London Vol 230 : 122-125.

71 Edward, A. A., Morton, M., and Grace, C. C. C.(1965). Optimal Condition for Mutagenesis by N- methy-N'- nitro-N-nitrosoguanidine in E. coli K-12 . Biochem.Biophys.Res. Commun.Vol.18:788-795.

72 Lowley, P. D.,and Brookes, P. (1961). Acidic Dissociation of 7 : 9 - Dialkylguanines and Its Possible Relation to Mutagenic Properties of Alkylation Agents. Nature Vol. 192:1081-1082.

73 Bautz, E.,and Freese, E. (1960). On the Mutagenic Effect of Alkylating Agents. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.Vol.46: 1585-1594.

74 Simpson, I. N., and Caten, C. E.(1979). Induced Quantitative Variation for Penicillin Titre in Clonal Populations of A. nidulans . J.Gen.Microbiol.Vol.110:1-12.

75 Alikhanian, S. I.,Mindline, S. Z.,Goldat,S.U.,and Vladimizov,A.V. (1959). Genetic of Organisms Producing Tetracyclines. Ann.N.Y.Acad.Sci.Vol.81:914-949.

76 Backus, M. P.,and Stauffer, J. F. (1955). The Production and Selection of a Family of Strain in Penicillium chrysogenum. Mycologia Vol.47:429-463.

77 Stauffer, J. F.,and Backus, M.P.(1954). Spontaneous and Induced Variation in Selected Stock of the Penicillium chrysogenum Series. Ann.N.Y.Acad.Sci.Vol.60:35-49.

78 Macdonald, K. D. , Hutchinson, J. M., and Gillete, W. A. (1963). Isolation of Auxotrophs of Penicillium chrysogenum and their Penicillin Yields. J.Gen.Microbiol.Vol.33: 365-374.

79 O'Sullivan, C. Y., and Pirt, S. J. (1973). Penicillin Production by Lysine Auxotrophs of Penicillin chrysogenum . J.Gen. Microbiol.Vol.76:65-75.

80 Arnstein, H. R. V.,and Grant, P. T. (1956).The Metabolism of the Penicillia in Relation to Pencillin Biosynthesis. Bacteriol.Review Vol.20:133-147.

81 วนิดา เรืองศรี.(2532). สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลลิน จีโดย เพนนิซิเลียม ไคลโซจีนัม เอ 88 .วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

82 McCormick, J. R.D.,Miller, P. A.,Growich, J. A.,Sjolander, N.O., and Doerschuk, A. P. (1958 a). Two New Tetracycline-Related Compounds : 7-Chloro-5a(11a)-Dehydrotetracycline and 5a-*epi*- Tetracycline. A New Route to Tetracycline. J.Am.Chem.Soc.Vol.80:5572-5573.

83 McCormick, J.R.D., Sjolander, N. O., Hirsch, U.,Jensen,E. R., and Doerschuk, A. P. (1957). A New Family Antibiotics: The Demethyl-Tetracyclines.J.Am.Chem.Soc.Vol.79:4561-4563.

84 McCormick, J.R.D., Sjolander, N.O., Miller, P. A.,Hirsch, U., Arnold, N. H.,and Doerschuk, A. P. (1958 b). The Biological Reduction of 7 - Chloro - 5 a(11a)-Dehydro tetracycline to 7-Chloro-Tetracycline by Streptomyces aureofaciens. J.Am.Chem.Soc.Vol.80:6460-6461.

85 Ballio, A.,Chain, E. B.,Dentice Di Accadia, F., Mastropietro-Cancellieri, M. F., Morpurgo, G., Serlupi-Crescenzi, G., and Sermonti,G.(1960). Incorporation of α,w-Dicarboxylic Acid as Side-Chain into the Penicillin Molecule. Nature Vol.185:97-99.

86 Kelner, A. (1949). Studies on the Genetics of Antibiotic Formation : the Induction of Antibiotic-Forming Mutation in Actinomyces. J.Bacteriol.Vol.57:73-92.

87 Ditchburn, P., Giddings, B., and Macdonald, K. D. (1974). Rapid Screening for the Isolation of Mutants of Aspergillus nidulans with Increased Penicillin Yields.J.Appl.Bact. Vol.37:515-523.

88 Ball, C.,and McGonagle, M.P.(1978).Development and Evaluation of a Potency Index Screen for Detecting Mutant of P. chrysogenum Increased Penicillin Yield. J.Appl.Bact.Vol. 45:67-74.

89 Pittenger, R. C., and McCoy, E. (1953). Variants of Streptomyces griseus Induced by Ultraviolet Radiations. J.Bacteriol.Vol.65:56-64.

90 Stuaffer, J. F., Schwartz, L. J., and Brady, C. W. (1966).

Problems and Progress in a Strain Selection Program with Cephalosporin-Producing Fungi.Developments in Industrial Microbiology Vol.7:104-113.

91 Scudi, J. V., and Woodruff, H. B. (1949). Assay of Penicillins. In Clarke, H. T., and Johnson, J.R.,(eds.), The Chemistry of Penicillin , pp. 1025 - 1042. U.S.A. : Princeton University Press.

92 Luengo, J. M., and Moreno, M. A. (1987). Separation by High-Performance Liguid Chromatography of Penicillins with C_4 to C_{10} Aliphatic Side Chains . Anal. Biochem.Vol.164: 559-562.

93 Schmidt, W.,and Moyer, A.J.(1943). Penicillin: Method of Assay. J.Bacteriol.Vol.47:199-210.

94 Linton, A. H. (1983). Theory of Antibiotic Inhibition Zone Formation,Disc Sensitivity Method and MIC Determination. In Russell, A. D., and Quesnel, L.B.,(eds.), Antibiotic: Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance, pp. 19-30. U.S.A. : Academic press.

95 Deo, Y. M., and Gaucher, G. M. (1983). Semicontinuous and Continuous Production of Penicillin G by Penicillium chrysogenum Cells Immobilized in *k*-Carrageenan Beads. Biotechnonoly and Bioengineering Vol.26:285-295.

96 Blaha, J. M., Knevel, A. M., and Hem, S. L.(1975).High-Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Penicillin G Potassium and its Degradation Products. J.Pharm.Sci. Vol.64:1384-1386.

97 Revilla, G., Lopez-Nieto, M.J., Luengo, J. M., and Martin, J. F. (1984). Carbon Catabolite Repression of Penicillin Biosynthesis by Penicillium chrysogenum . J.Antibiotics

Vol.37:781-789.

98 Luengo, J.M.(1985). Precipitation of Phenyl and Phenoxypenicillin from Solutions Using Ammonium Sulfate. Anal. Biochem. Vol.149:466-470.

99 Masurekar, P. S.,Kahgan, M. P.,and Demain, A.L.(1972).Mutagenesis and Enrichment of Auxotrophs in P. chrysogenum .Appl. Microbiol.Vol.24:995-996.

100 Park, Y. K., and De Sznti, M. S. S. S.(1977).Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from Aspergillus awamori. J.Ferment.Technol.Vol.55:193-195.

101 Kaneyuki, H.,Deno, H.,Hiratsuka, J.,Matsuyoshi,T.,and Furakawa,T. (1980). Production of Sebacic Acid from *n* - Decan by Mutants Derived from Torulopsis candida . J.Ferment. Technol.Vol.58: 405-410.

102 โชตนา ประมวลวัลลิกุล. (2534).การกลายพันธุ์ Penicillium chrysogenum เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนนิซิลลิน จี .วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ Penicillium chrysogenum และใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มปริมาณสปอร์

PDA (potato dextrose agar)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- มันฝรั่ง (Potato infusion) 300 กรัม
  (ต้มในน้ำเดือดแล้วกรองเฉพาะน้ำใส)
- เดกซ์โตรส (Dextrose) 20 กรัม
- ผงวุ้น (Agar) 20 กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ , เลี้ยงเชื้อ Staphylococcus aureus และใช้ทดสอบหาปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี bioassay

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- แบคโตเปปโตน (Bacto-peptone) 10 กรัม
- สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) 5 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัม
- อาการ์ (Agar) 15 กรัม

ปรับ pH เป็น 7.2 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดัน เป็น เวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารเหลวที่ใช้ในงานหมักเพื่อผลิตเพนนิซิลลิน จี (81)

(Fermentation medium)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- แลคโตส (Lactose)	30	กรัม
- กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
- สารละลายที่ได้มาจากการย่อยกาก * ถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วด้วยกรดกำมะถัน (H_2SO_4 Hydrolysate of soybean meal)	347	มิลลิลิตร
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$)	5	กรัม
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	0.6	กรัม
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 ,	0.6	กรัม
- แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$)	0.5	กรัม
- แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	5	กรัม
- น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil)	4	มิลลิลิตร
- ผงวุ้น (Agar)	20	กรัม

ปรับ pH เป็น 6.1 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 $^{\circ}$ เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ /ตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 30 นาที ในกรณีเตรียมเป็นอาหารเหลวไม่ต้องใส่ผงวุ้น

* การเตรียมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วด้วยกรดกำมะถัน

ชั่งกากถั่วเหลืองขนาด 20 เมช (0.84 มิลลิเมตร) มา 12 กรัมเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปใส่หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ เซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที สกัด 2 ครั้งด้วยน้ำปริมาตร 50 และ30 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ แยกเอาเฉพาะส่วนใสมาใช้

2 สารละลายและบัฟเฟอร์

2.1 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำกลายพันธุ์ด้วย NTG

ทริส-มาลิอิค บัฟเฟอร์ (Tris-maleic buffer)ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ทริส (tris) 6.1 กรัม/ลิตร
- มาลิอิค (maleic acid) 5.8 กรัม/ลิตร

ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH

2.2 บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเพนนิซิลลิน จี เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์เพนนิซิลลิน จีโดยวิธีชีววิทยา

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

-ไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4) 2 กรัม/ลิตร

-โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH_2PO_4) 8 กรัม/ลิตร

2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการวิเคราะห์เพนนิซิลลิน จี ด้วย HPLC

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต : เมธานอล = 65 : 45 ปริมาตร/ปริมาตร

- โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH_2PO_4) 50 มิลลิโมล/ลิตร และปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย KOH (2 โมล/ลิตร)
- เมธานอล (methanol)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

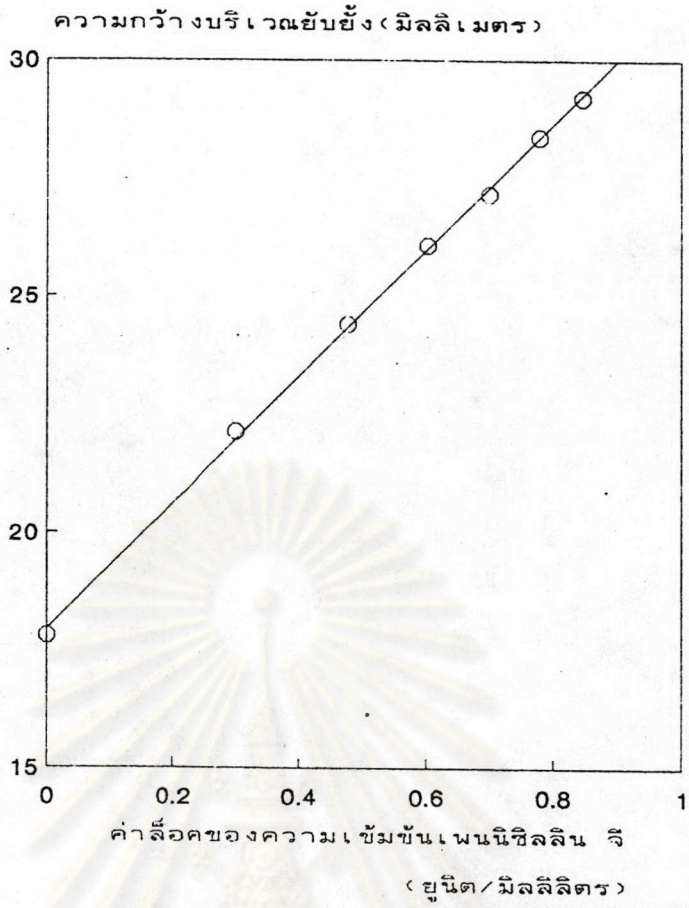
3 กราฟมาตรฐาน

3.1 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีชีววิทยา

เป็นกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ เพนนิซิลลิน จี โซเดียม (ยูนิต/มิลลิลิตร) และความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร) การเตรียมโดยชั่งเพนนิซิลลิน จี โซเดียม มาตรฐาน(1 มิลลิกรัม =1677 ยูนิต) ละลายในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 เจือจางด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 3, ,4, 5, 6 และ 7 ยูนิต/มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตหยด 50 ไมโครลิตรของแต่ละความเข้มข้นลงใน 1 หลุมซึ่งเจาะด้วย steel cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร บนอาหารวุ้นทดสอบที่มี S. aureus บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของ S. aureus (มิลลิเมตร) รอบหลุมที่เจาะไว้ ดังแสดงใน ตารางที่ 27 วาดกราฟระหว่างค่าล็อคของความเข้มข้น (ยูนิต/มิลลิลิตร) ของเพนนิซิลลิน จี โซเดียม(แกน x) กับความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของ S. aureus (มิลลิเมตร) ให้เป็น (แกน y) ดังแสดงใน รูปที่ 34

ตารางที่ 27 : กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา

ความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี โซเดียม (ยูนิต / มิลลิลิตร)	ค่าล็อคของความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี โซเดียม (ยูนิต / มิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้งการเจริญของ S. aureus (มิลลิเมตร)
1	0	17.79
2	0.301	22.13
3	0.477	24.38
4	0.602	26.08
5	0.699	27.17
6	0.778	28.38
7	0.845	29.21



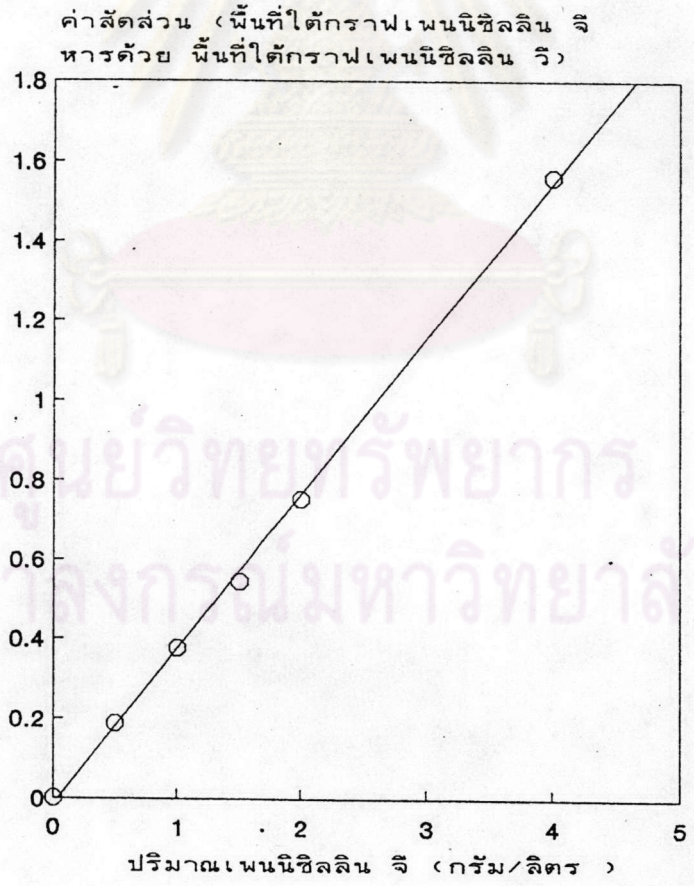
รูปที่ 34 : กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีชีววิทยา จากความสัมพันธ์ ค่าล็อคความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี = (ความกว้างบริเวณยับยั้ง-จุดตัดแกน Y)/ค่า slope พบว่าค่า slope = 13.418 และค่า จุดตัดแกน Y = 17.923

3.2 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลลิน จี วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบคือ เพนนิซิลลิน วี

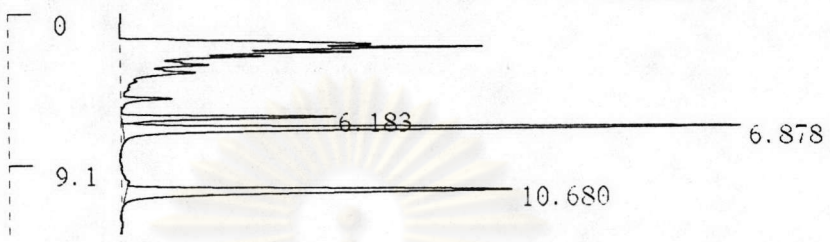
ชั่งเพนนิซิลลิน จี โซเดียม 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำให้เป็น 0.5 1 1.5 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นผสมกับสารละลายเพนนิซิลลิน วี มาตรฐานเปรียบเทียบปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ชั่งเพนนิซิลลิน วี 0.6 กรัม ละลายในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 20 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ 1 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ฉีด 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะดังที่กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลองที่ 4.2.2 ค่า ratio ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟเพนนิซิลลิน จี หารด้วยพื้นที่ใต้กราฟเพนนิซิลลิน วี ที่ได้ ดังแสดงใน **ตารางที่** 28 นำไปเขียนกราฟโดยกำหนดให้ค่าความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี มาตรฐานเป็นแกน X และค่า ratio เป็นแกน Y ดังแสดงใน **รูปที่** 35

ตารางที่ 28 : กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี โซเดียม (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟของเพนนิซิลลิน จี / พื้นที่ใต้กราฟของเพนนิซิลลิน วี (ค่า Ratio)
0.0	0.0000
0.5	0.1873
1.0	0.3762
1.5	0.5433
2.0	0.7534
4.0	1.5600



รูปที่ 35 : กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดย HPLC จากความสัมพันธ์ ความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี =(ค่า Ratio-จุดตัดแกน Y)/ค่า slope พบว่ามีค่า slope = 0.1157 และค่า จุดตัดแกน Y = 0.0164



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC
1	1	6.183	5191	379			14.861
	2	6.878	16274	1081	V		46.5915
	3	10.68	13464	679			38.5475
		TOTAL	34929	2139			100

รูปที่ 36 : รูปตัวอย่างจากการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้เพนนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

เพนนิซิลลิน จี มีค่า retention time ของ peak ที่ 6.878 นาที และเพนนิซิลลิน วี มีค่า retention time ของ peak ที่ 10.680 นาที ความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี ที่วิเคราะห์ได้ในรูปนี้คือ 3.132 กรัม/ลิตร

4 ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและค่าโพเทนซี อินเดกซ์

ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 29 ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ (ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี) และค่าเฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 30 ของสายพันธุ์ N-151 U-59 UN-696 UNN-645 UNNN-354 ซึ่งได้จากการใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุม(สายพันธุ์ตั้งต้น) ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิจากการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น

ตารางที่ 29 : ค่าความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) และค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ตั้งต้นในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนซ้ำ				
	N-151	U-59	UN-696	UNN-645	UNNN-354
27	1	0.00	0.00	0.00	0.00
28	6	0.00	0.00	0.00	0.00
29	8	0.00	0.00	0.00	0.00
30	53	0.00	0.00	0.00	0.00
31	13	0.00	0.00	0.00	0.00
32	5	0.00	1	0.00	0.00
33	2	0.00	2	0.00	0.00
34	1	1	2	0.00	0.00
35	0.00	44	6	0.00	0.00
36	0.00	15	19	2	0.00
37	0.00	0.00	34	15	0.00
38	0.00	0.00	3	33	0.00

ตารางที่ 29 ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนซ้ำ				
	N-151	U-59	UN-696	UNN-645	UNNN-354
39	0.00	0.00	0.00	0.00	10
40	0.00	0.00	0.00	0.00	35
รวม (ซ้ำ)	89	60	67	50	45
ความกว้างเฉลี่ย	30.11	35.23	36.30	37.62	39.78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 : ค่าโพเทนซี อินเดกซ์(ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี) และค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ตั้งต้นในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น

ค่าโพเทนซีอินเดกซ์	จำนวนซ้ำ				
	N-151	U-59	UN-696	UNN-645	UNNN-354
2-3	14	-	26	-	-
3-4	75	57	41	49	42
4-5	-	3	-	1	3
รวม (ซ้ำ)	89	60	67	50	45
ค่าโพเทนซีอินเดกซ์เฉลี่ย	3.26	3.61	3.11	3.48	3.68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นาย บัณฑูร พลอยสุวรรณ เกิด 26 สิงหาคม 2509 ที่จังหวัดพิจิตร

ประวัติการศึกษา -มัธยมต้น (พ.ศ.2522-2525) รร.โชติรวี จ.นครสวรรค์
-มัธยมปลาย(พ.ศ.2525-2528) รร.มงฟอร์ตวิทยาลัย จ.เชียงใหม่
-อุดมศึกษา (พ.ศ.2528-2532)วท.บ.ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
-บัณฑิตวิทยาลัย (พ.ศ.2533-2536) วท.ม. เทคโนโลยีทางชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการทำงาน -ตำแหน่งหัวหน้าฝ่ายผลิตส่วนหมัก (fermentation supervisor)
โรงงานตะวันออก เคมีเกิ้ล (พ.ศ.2532-2533)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย